

氏 名	青 木 考
生 年 月 日	
本 籍	福島県
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博甲第240号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	Coordination of Plastid Differentiation with Organ Differentiation（プラスチド分化と器官分化の整合性）
論 文 審 査 委 員	（主査）和田敬四郎 （副査）福森 義宏, 櫻井 勝, 星名 哲, 山口 和男

## 学位論文要旨

A potential coordination of the differentiation processes of organ and plastid in higher plant was investigated by analyzing a subcellular localization of ferredoxin (Fd) isoproteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Five Fd isoproteins (FdA, FdB, FdC, FdD, and FdE) were isolated from tomato fruit. These isoproteins showed differential temporal and spatial accumulation patterns. FdA and FdC were present in leaves, FdE was present in roots, and FdB and FdD were fruit-specific. During fruit growth, the relative abundance of FdA decreased and that of FdE increased. The FdE/FdA ratio was higher in the inner tissues of the fruit than in the outer tissue, and it was correlated with starch accumulation. In dark-grown fruits, contents of FdA, FdB, and FdC were much less than in their light-grown counterparts; however, contents of FdE and starch did not change significantly. Under in vitro conditions FdE showed higher cytochrome c reduction activity than FdA and FdB. These results indicate that both photosynthetic and heterotrophic Fd isoproteins were present in tomato fruit irrespective of photosynthetic competence. However, it was left to be elucidated if two types of Fd isoproteins were present in the identical plastid or not. In isolated fruit chloroplasts and fruit chromoplasts, both photosynthetic and heterotrophic Fds (FdA and FdE, respectively) were detected by immunoblotting. Using double-staining immunofluorescence microscopy, colocalization of FdA and FdE in the identical plastid was demonstrated. It was also shown that FdA and FdE were colocalized in fruit chloroplasts and chloroamyloplasts irrespective of sink status of the plastid. Using immunoelectron microscopy, it was shown that FdA and FdE were localized in the plastid stroma, and both isoproteins seemed to randomly distribute within the stroma. To get insight into significance of the heterotrophic Fd in fruit plastids, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was estimated in isolated fruit and leaf plastids. Fruit chloroplasts and chromoplasts showed much higher G6PDH activity than leaf chloroplasts, suggesting that high G6PDH activity is coupled to FdE to maintain nonphotosynthetic production of reducing power. These results suggest that fruit chloroplast is different from its leaf counterpart despite their morphological resemblance, and also suggest that differentiation

of plastid is coordinated with the organ differentiation.

## 1 はじめに

植物細胞内の小器官の一つであるプラスチドは、その細胞が存在している器官・組織によって、様々な形態をとることが知られている。根と葉を見てみると、その違いがよく分かる。根にはデンプン蓄積を行なうアミロプラストが、葉には専ら光合成を行なうクロロプラストが存在する。このように、これら2つの器官では、プラスチドが形態的にも機能的にも異なった物になっている。近年、プラスチドタンパク質の1つであるフェレドキシン(Fd)の研究から、根と葉ではプラスチドタンパク質も異なった物になっている事が分かってきた。すなわち、根と葉に存在しているフェレドキシンは互いに異なるアイソフォームなのである。この事実は、プラスチドとプラスチドタンパク質の分化は器官その物の分化と深く関わっている事を示唆するように見える。しかしながら、根と葉は機能的にも全く異なっているため、器官の違い自体が分化に影響するのか、器官の持つ機能の違いが分化に影響するのか不明確であった。

この問題を考えるに当って、ひとつの器官がその機能的特性を変化させる事例や、ひとつのプラスチドが複数の器官に存在している事例を解析することは、有益な情報をもたらしてくれる。トマトの果実はそのよい例である。それは緑色の時期は光合成機能を維持しているが、赤色になるとともに非光合成的に機能するようになる。加えて、トマト緑色果実は葉のようにクロロプラストを持っている。本研究では、トマト果実においてフェレドキシンのアイソプロテインのプラスチドレベルでの局在性を解析することにより、プラスチド分化と器官分化の相互作用を明らかにすることを試みた。

## 2 トマトからのフェレドキシンアイソプロテインの精製と、それらの分布パターンの解析

赤色トマト果実から FdA, FdB, FdC, FdD, FdE という 5 種のアイソプロテインが精製された。N 末端アミノ酸配列を見ると、FdA と FdC はトマト葉の Fd と同じ物、新規に見いだされた FdE は、他の植物の根の Fd と相同性の高い物、FdB と FdD も新規に見いだされた物で、それぞれ葉の Fd・根の Fd と相同性が高かった。これらの Fd は分光学的にはよく似た性質を示した。しかし、Fd-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR)依存性のシトクロム c 還元活性を調べて見ると、FdE が FdA や FdB と比べて 2 倍程度高い電子伝達活性を示す事が分かった。これは FdE が FdA や FdB よりも、NADPH から電子を受け取る方向に有利に働く事を示している。

トマトでの Fd アイソプロテインの分布パターンを調べるために、FdA と FdE に対する抗体を作製した。これらの抗体を用いてトマト果実発育段階別に Fd A

イソプロテインの蓄積パターンを調べて見ると、アイソプロテインごとに異なったパターンを示すことが明らかになった (Figure 1)。FdA は果実の成長に伴い減少していた。逆に、 FdE は果実の成長に伴い相対的に増加する傾向にあった。FdC と FdB は成長段階によらずほぼ一定であった。また果実を exocarp、inner pericarp、columella と分けて Fd アイソプロテインの蓄積パターンを調べて見ると、 exocarp、inner pericarp、columella の順で FdE の相対量が多くなっていた。

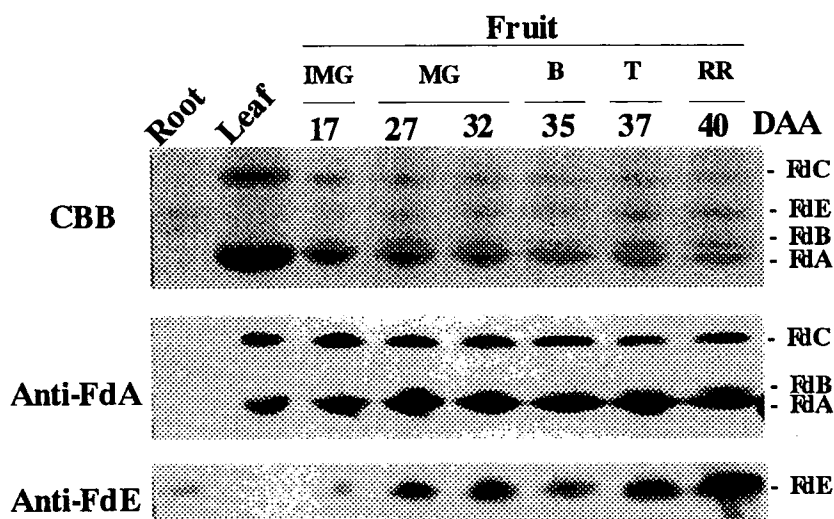


Figure 1 果実成長段階別に見た Fd 蓄積パターンの変化。

こうした量的な変化はあったものの、すべてのアイソプロテインは、すべての成長段階およびすべての果実組織で蓄積が見られ、定性的意味での成長段階や組織に対する蓄積の特異性は見られなかった。このことは、Fd アイソプロテインの蓄積パターンが、クロロプラストクロモプラスト変換にも依存しない、ということを示している。また、根と葉からも Fd が検出され、根の Fd は FdE と同じもの、葉の Fd は FdA・FdC と同じ物であることが明らかになった。更に、アイソプロテインの蓄積に対する光の影響を調べるために暗所生育した果実での Fd 蓄積パターンを明所生育した果実のそれと比較してみた。すると暗所生育した果実では FdA・FdB・FdC が 30% レベル程度まで減少する一方で、FdE はほとんど影響を受けていない事がわかった。

以上の事から、まずトマト果実から精製された Fd アイソプロテインは 2 種に大別できることが分かった。1 つは、その蓄積が光によって制御され、FNR 依存性シトクロム c 還元活性の比較的低い、光合成タイプのアイソプロテイン (FdA・FdB・FdC)。もう 1 つは、光による制御を受けず、FNR 依存性シトクロ

μc還元活性の比較的高い、従属栄養タイプのアイソプロテイン(FdE)、である。Fd アイソプロテインはトマト果実の成長段階・果実内組織に依存した分布パターンを示すが、それは定量的な特徴であり、定性的には成長段階・果実内組織についての特異性を示さない事が分かった。すなわち、トマト果実では、成長段階・光合成能力の有無・糖貯蔵能力の有無にかかわらず、光合成・従属栄養両タイプの Fd アイソプロテインが混在している、という事になる。

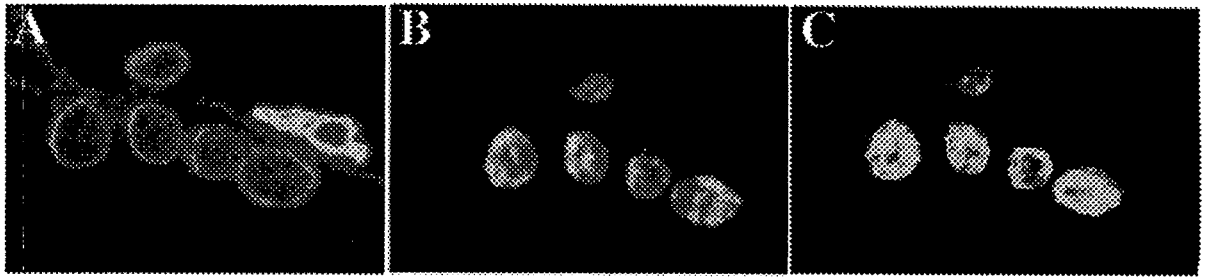
### 3 光合成タイプ・従属栄養タイプの Fd アイソプロテインは、同じ果実プラスチド内にある

では、果実内で両タイプの Fd アイソプロテインは、プラスチドレベルではどのように局在しているのだろうか？ 2つのモデルが想定可能である。1つは、両タイプの Fd アイソプロテインとも、1つの同じ果実プラスチドに存在している、というモデル。もう1つは、果実内にはお互いに分化した光合成的・従属栄養的な2種のプラスチドが存在し、光合成タイプ Fd は光合成的プラスチドに、従属栄養タイプ Fd は従属栄養的なプラスチドに、各々分かれて局在している、というモデルである。そこで、光合成タイプ Fd として FdA を、従属栄養タイプとして FdE を選び、それらがプラスチドレベルでどのように局在しているのかを調べた。果実からクロロプラスト・クロモプラストを単離して Fd 組成を調べてみると、確かにどちらのプラスチドにも FdA・FdE が検出された。しかし単離プラスチド画分は、Fd 組成の異なる複数種のプラスチドの混合状態にあるのかもしれない、これだけから結論は出せない。この問題を克服するために、免疫細胞化学的手法により個々のプラスチドレベルで Fd の局在をみることにした。

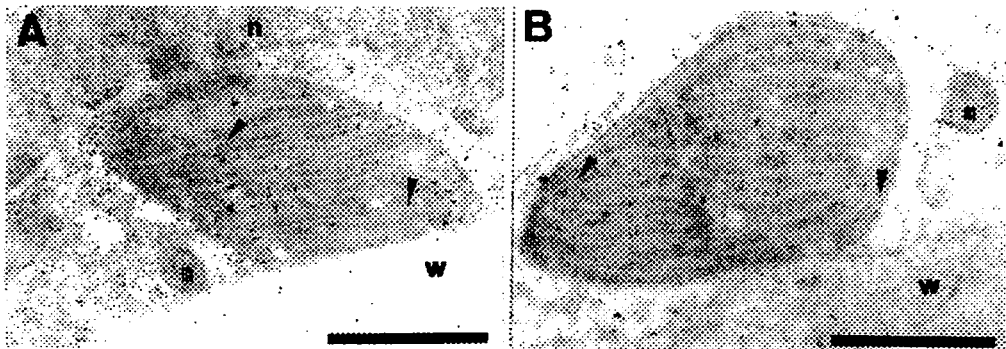
まず、2重染色免疫蛍光法による Fd 局在性の解析を行なった。開花前の果実から直径23 mmの果実までから切片を作り、抗 FdA 抗体と抗 FdE 抗体で2重染色してみると、明らかに同一のプラスチドから FdA・FdE 両者の存在が確認された(Figure 2)。columella や mesocarp に見られるデンプンを多量に含んだプラスチド(クロロアミロプラスト)から特に強い蛍光が検出された。面白いことに mesocarp ではクロロアミロプラストとクロロプラストの間での相互変換が起きている事もわかった。この結果により、果実のプラスチドは FdA・FdE 両者を含んでいることが明らかになった。

次に、FdA・FdE のプラスチド内での分布に違いがあるかどうかを調べるために、金コロイド免疫電顕法により果実プラスチドを調べた。果実クロロプラストとクロモプラストにおいて、プラスチドのストロマに FdA・FdE が検出され、両者の分布に大きな違いは見られなかった(Figure 3)。

金コロイド免疫電顕法ではクロロアミロプラストの超薄切片を得ることができなかったため、HRP 免疫電顕法による果実プラスチドの観察を行なった。するとクロロアミロプラストでもストロマに FdA・FdE が検出され、デンプン粒内



**Figure 2** 2重染色免疫蛍光法による果実クロロアミロプラストにおける FdA と FdE の検出。(A)DAPI による DNA の染色。(B)FITC による抗 FdA 抗体反応部位の検出。(C)TRITC による抗 FdE 抗体反応部位の検出。同一のプラスチドに FITC と TRITC の蛍光が見られる。



**Figure 3** 金コロイド免疫電顕法による果実クロロプラストにおける FdA と FdE の検出。(A)抗 FdA 抗体を使用。(B)抗 FdE 抗体を使用。n, 核; m, ミトコンドリア; w, 細胞壁。矢頭, 10 nm 金コロイド。バー, 1  $\mu$ m。

部には Fd は見られなかった。

以上の結果は、果実プラスチドが葉プラスチドとも根プラスチドとも異なるものである事を示唆している。根プラスチドとの違いは、果実プラスチドは光合成機能・光合成タイプ Fd という点で明らかであろう。では果実プラスチドでの従属栄養タイプ Fd の存在は、葉プラスチドとのどのような違いを示唆しているのだろうか？従属栄養タイプ Fd の光合成タイプ Fd との機能的な違いは、NADPH から電子を受容する能率が高いことである。それでは葉と果実のプラスチドの機能的違いは、非光合成的に NADPH を生産する部分にあるのではないだろうか。この推論を検証するために、果実プラスチドのグルコース 6 リン酸脱水素酵素活性とグルコース 6 リン酸トランスロケター活性を調べた。葉クロロプラストにおけるこれらの活性との比較を行ってみると、果実プラスチドではいずれの活性も非常に高かった。この結果は、果実プラスチドの葉クロロプラストとの機能的な分化が生じている事を示した。

これまでの結果から、プラスチドは器官の分化に応じて分化している事が明らかとなった。では、この器官に応じた分化というのは器官の代謝特性によりコントロールされているのか、それとも発生プログラムそのものによってコントロールされているのかを明らかにするために、ある器官で通常の状態では検出されないFdアイソプロテインが代謝条件を変える事により誘導され得るかどうかを試みた。FdEはその果実内分布などから糖により量的コントロールを受けることが推測される。そこで通常FdEの見られない葉に暗所でシェークロース処理することによって、葉でFdEを誘導できるかどうかを調べた。結果は、FdEはシェークロース処理によっては葉に誘導されず、葉には未同定の新しいFdアイソプロテインが誘導された。

得られた結果を総合すると、植物でのプラスチド分化は器官分化により強い制約を受けること、そしてその器官による制約は器官の代謝的特性によるものではなく器官の発生プログラムによりコントロールされている可能性が高いこと、が結論された。

## 学位論文審査結果の要旨

植物に特有なオルガネラであるプラスチドは、葉緑体や色素体など様々な形を取り、植物の生存にきわめて重要な機能を果たしている。プラスチドは根元的にはすべて同一物でありながら、植物の器官分化・組織分化に呼応して、細胞核との間で情報の交換をしながら形は機能を変え、生長時期や場所にあった分化を行っている。このようなプラスチドの分化と植物の組織や器官の分化の関係はこれまでも重大な問題であったが、最近の種々の実験技術の進歩によって新たな局面を迎えつつある。青木 考氏の研究は、プラスチドに固有の電子伝達タンパク質であるフェレドキシン (Fd) のイソタンパク質の分布と機能の違いをトマト果実について調べることから出発し、プラスチドの分化は組織分化の制約の下に、またさらに大きく器官分化の制約の下に制御されていることを形態観察や免疫化学的手法を駆使して明らかにした。

まず、トマト果実における5種のFdイソタンパク質の存在を、それぞれを単離し、N末端アミノ酸配列から確認した。それらは機能上光合成的なものと非光合成的なものに分類され、それらの量比は、果実の成長段階、組織さらには果実の生育条件によっても変動することを2種類の免疫抗体を用いて明らかにした。光合成的または非光合成的Fdの2種を光学顕微鏡的に蛍光抗体法で識別し、両タイプとも同一のプラスチドに存在すること、さらに金コロイド免疫電顕法やHRP免疫電顕法によりプラスチド内部のストロマに存在することを明らかにした。果実プラスチドは、種々の性質の違いから葉のプラスチドや根のプラスチドとも異なったものであることを明らかにした。また人為的に生理的条件を変えても、Fdイソタンパク質の発現が変更されないことが分かり、プラスチドは器官分化により強い制約を受けていること、さらにそれは器官の発生プログラムによりコントロールされている可能性が高いこと等を明らかにした。

青木 考氏の研究成果はプラスチド分化と器官分化の関係を明らかにする重要なポイントとなるもので、今後のこの分野の発展の基礎をなすものといえる。このような観点から、本論文は博士論文に十分値するものと判断される。